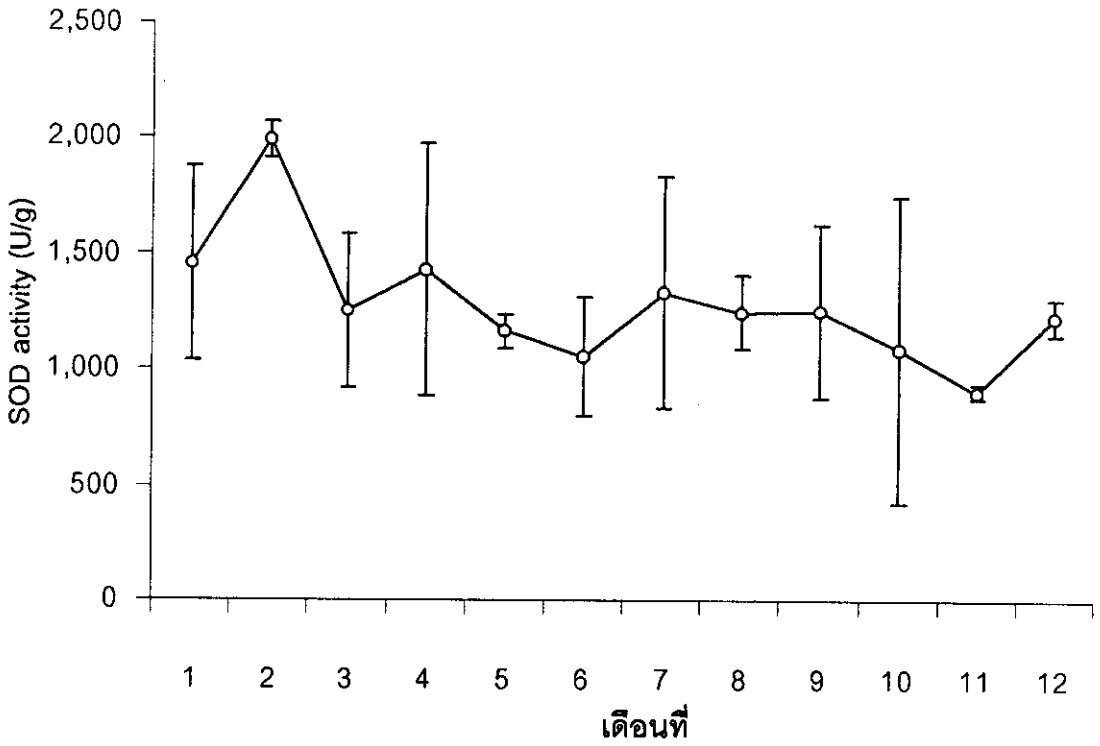
4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณ SOD ในใบยางพารา

ในใบยางพารา ทั้งพันธุ์พื้นเมืองและRRIM 600 (ดังตารางที่ 6) มี SOD 1,230 ± 222 และ 1,275 ± 448 หน่วย ต่อกรัมใบยาง ตามลำดับ SOD สูงกว่า SOD ในก้านใบ 650 ± 492 และ 556 ± 494 หน่วยต่อกรัมก้านใบตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ก้านใบมีความว่องไวจำเพาะสูงกว่าใบยาง เนื่องจากก้านใบมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าใบยางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า SOD ในใบยางพันธุ์ RRIM 600 มีความว่องไว เท่ากับ 649, 466 และ 131 หน่วยต่อกรัมใบยาง (วรวิทย์, 2539; กมลวรรณ, 2540 และ ฉวีวรรณ, 2541 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าความว่องไวของ SOD ในใบพืชอื่น ๆ มีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไป ในใบผักโขมมี SOD มากที่สุด 25,250 หน่วยต่อกรัม (Asada *et al.*, 1973) น้อยที่สุดในใบมัสตาร์ด 18.6 หน่วยต่อกรัม (Salin and Bridges, 1980) และความว่องไวของ SOD ในพืชทั่วไป พบว่าอยู่ในช่วง 100 - 1,000 หน่วยต่อกรัม (Sawada *et al.*, 1972; Beauchamp and Fridovich, 1973; Misra and Fridovich, 1977; Kono *et al.*, 1979; Baum and Scandalios, 1981; Salin and Bridges, 1982; Duke and Salin, 1983; Tanaka *et al.*, 1996; Suvachittanont and Kasisadapan, 1996; Palma *et al.*, 1997; Yamahara *et al.*, 1999) ดังตารางที่ 10

ในการศึกษาปริมาณ SOD กับความอ่อนแก่ของใบยาง RRIM 600 ต่อน้ำหนักใบ 1 กรัมเท่ากันในตารางที่ 5 พบว่าใบระยะที่ 3 (ใบแก่) มีปริมาณ SOD สูงสุด เท่ากับ 1,354 ±281 หน่วย มากกว่าใบระยะที่ 1 (ใบอ่อน), ใบระยะที่ 4 (ใบแก่จนเหลือง) และใบระยะที่ 2 (ใบแก่ปานกลาง) ซึ่งมีความว่องไว 1,280 ± 221, 1,197 ±106 และ 1,041 ± 422 หน่วย ตามลำดับ สอดคล้องกับ พยาธิ *Schistosoma mansoni* พบว่า ปริมาณ SOD แปรผันตรงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (Hong *et al.*, 1992) แต่ปริมาณ SOD ในใบยางระยะต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เพราะว่าค่า ± SD ของการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง นอกจากนี้พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามอายุของ

ใบยางคือ ในใบแก่จนเหลืองมีปริมาณโปรตีนมากกว่าใบแก่, ใบแก่ปานกลาง และใบอ่อน เท่ากับ 38.0 ± 5.9, 35.4 ± 8.3, 27.2 ± 2.5 และ 21.2 ± 3.6 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัม ตามลำดับ ทำให้ค่าความว่องไวจำเพาะในใบอ่อนมีค่าสูงสุดคือ 60.4 ± 3.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ SOD ในใบยางมีความแปรผันตามฤดูกาลอีกด้วย (รูปที่ 19) เพราะความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น แสงที่มากเกินไป (Cakmak and Marschner, 1992; Mishra *et al.*, 1995), มลภาวะทางอากาศ, ความแห้งแล้ง (Zhang and Kirkham, 1994), น้ำท่วม (Yu and Rengel, 1999), ความเค็ม (Hernandez *et al.*, 1995), ความเป็นพิษจากโลหะหนัก (Chongpraditnun *et al.*, 1992) และ ขาดธาตุอาหาร (Cakmak and Marschner, 1988; Tanaka *et al.*, 1995) เป็นต้น



รูปที่ 19 ปริมาณ SOD ในใบยางพาราที่เก็บในเดือนต่าง ๆ ในช่วง 29 มีนาคม พ.ศ. 2542 ถึง 23 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2543

4.2 สมบัติของ SOD

การเก็บ SOD ที่สกัดจากใบยางพาราที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าไม่ว่าจะเก็บ SOD ที่อุณหภูมิใดก็ไม่สามารถเก็บรักษา SOD ได้ เช่น ในวันที่ 1 จะเห็นว่า SOD ลดลงมากกว่าครึ่งเหลือประมาณ 40% ในวันที่ 3-15 พบว่า SOD ขึ้นลงอย่างไม่มีแบบแผน ส่วนวันที่ 30-90 พบว่า SOD ลดลงใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3) ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลของการนำตัวอย่างที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ มาทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้อง ที่ทำการทดลองหาความว่องไวของเอนไซม์ ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ที่วิเคราะห์โดยวิธี NBT แตกต่างกัน

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง SOD, POx และปริมาณเนื้อยางแห้ง

เนื่องจาก SOD ทำให้เกิด H_2O_2 และ H_2O_2 จะถูกสลายโดย POx ดังนั้น จึงคาดว่า SOD และ POx ควรจะมีความสัมพันธ์กันสูง แต่ค่าสหสัมพันธ์ที่ได้ไม่สูงนัก (รูปที่ 4, 5 และ 6) แสดงว่า H_2O_2 ที่เกิดขึ้นอาจจะถูกสลายโดยกลไกอื่นนอกจาก POx ได้ด้วย (De Leonardis *et al.*, 2000) และในการหา SOD ด้วยวิธี NBT อาจเป็นสาเหตุให้ได้ค่าความว่องไวของ SOD ที่เกิดจากสารอื่นด้วย

จากการศึกษาของ Sattayasevana, 1990 รายงานว่า POx จากเปลือกยางมีความสัมพันธ์กับน้ำยางสดและน้ำยางแห้ง และในต้นยางที่เป็นโรคเปลือกยางแห้งพบว่าระดับของ SOD จะต่ำ (Miao and Gaynor, 1993) แต่จากผลการศึกษาพบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง DRC กับ SOD และ POx มีค่าต่ำนั่นคือ ความสัมพันธ์ระหว่าง DRC กับ SOD และ POx มีความสัมพันธ์กันน้อย แสดงว่าในการสร้างยางมีความเกี่ยวข้องกับ O_2^- ซึ่งเป็นตัวที่มีผลต่อปริมาณ SOD และ POx ค่อนข้างน้อย

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง DRC จากน้ำยางและ SOD, POx จากใบยางพารา ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์แสง ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณแสง (Cakmak and Marschner, 1992; Mishra *et al.*, 1995) แต่เนื่องจาก SOD เป็น secondary metabolite ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ defense mechanism จึงใช้เป็นตัวแทนปริมาณ SOD ในการหาความสัมพันธ์กับ DRC ได้ แต่หากพิจารณา

SOD และ DRC ที่อยู่ในน้ำยาง อาจพบความสัมพันธ์ที่สูงกว่า ดังนั้นในอนาคตควรศึกษาความสัมพันธ์ของ SOD และ DRC ในน้ำยางด้วย

4.4 การทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์

การแยกซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสให้บริสุทธิ์ที่ได้ศึกษา 2 วิธี พบว่าวิธี ที่ 1 ได้ SOD ในส่วน S_3 สูงกว่าในส่วนตะกอนที่นำมาละลายกลับ (S_4) (ดังตารางที่ 7, 8, 9 และ 10) จากตารางที่ 7, 8, 9 และ 10 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำ S_3 ผ่านคอลัมน์ CM Cellulose ค่าความว่องไวของ SOD ลดลงอย่างมากทั้งนี้ อาจเนื่องจาก cofactor บางส่วนหลุดออกทำให้ SOD อยู่ในสภาพที่ไม่ว่องไว หรือ SOD อาจจับกับเมมเบรนของถุงไดอะไลซีส หรืออาจเป็นเพราะสารโมเลกุลเล็กที่เคยทำให้ค่า SOD สูงกว่าความเป็นจริงถูกกำจัดออกไป ทำให้ความว่องไวของ SOD บางส่วนสูญหายไปในขั้นตอนนี้ ในขณะที่กำจัดโปรตีนอื่นออกได้ไม่มาก ทำให้ความบริสุทธิ์ไม่เพิ่มขึ้นมากนัก จึงไม่นำเอา S_3 มาไดอะไลซ์และทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนนำมาผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นในครั้งต่อ ๆ ไป

เมื่อรวม SOD ที่มีความว่องไวสูงที่แยกได้จากคอลัมน์ CM Cellulose มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่า SOD ถูกชะออกมาในพีคที่ไม่แยกจากโปรตีนอื่น ๆ มากนัก ไม่สามารถแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ (รูปที่ 8) คอลัมน์นี้จึงไม่เหมาะสมในการแยก SOD จากใบยางพาราโดยวิธีนี้ จึงได้เปลี่ยนวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีที่ 2

การแยก SOD ให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่ 2 ซึ่งเปลี่ยนวิธีการตะกอนโปรตีนเป็น 40-80% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ได้ตะกอน P_3 นำมาละลายกลับเป็น S_4 และนำสารละลาย S_4 ที่ได้ผ่านลงคอลัมน์ DEAE- Sephacel พบว่า SOD ถูกชะออกมาในพีคแรก (รูปที่ 9) จากรูปจะเห็นว่าคอลัมน์ได้กำจัดโปรตีนส่วนหนึ่งออกไป SOD ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้น 1.7 เท่า (ตารางที่ 11)

SOD ที่ถูกชะออกมา ในพีคแรกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel หากมี การนำเอนไซม์ไปไดอะไลซ์เพื่อกำจัดเกลือก่อนการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ SOD น่าจะ

จับกับคอลัมน์ DEAE-Sephacel และออกมาภายหลังเมื่อชะด้วยเกลือ NaCl เพราะ SOD น่าจะมีประจุลบเพราะถูกชะออกมาก่อนเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Karpinska *et al.*, 2001 ค่า pI ในพืชมีค่าเท่ากับ 5.5

เมื่อนำมาแยกต่อโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 โปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค โดยพบ SOD ในพีคแรกเท่านั้น ความว่องไวของ SOD คิดเป็น 0.04% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.1 เท่า ดังตารางที่ 11

4.5 ความบริสุทธิ์ของ SOD ที่แยกได้

SOD ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีอย่างน้อย 3 แถบ ซึ่งแถบที่มีโปรตีนน้อยมากและยังมีโปรตีนอื่น ๆ ปนอยู่ เมื่อทำให้เจือจางลง 10 เท่าจะมีแถบเอนไซม์เพียงแถบเดียว ใน ND–PAGE ซึ่งเมื่อนำมาเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน LMW พบว่า SOD มีขนาด 56,104 ดาลตัน เพราะว่าเมื่อทดลองลดปริมาตรตัวอย่างในเจลพบว่าเหลือเฉพาะแถบล่างสุด (รูปที่ 13) ในขณะที่เมื่อเพิ่มปริมาตรตัวอย่างจะพบแถบเพิ่มขึ้นอีก 2 แถบ เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน LMW มีขนาด 137,088 และ 88,920 ดาลตัน นอกจากนี้เมื่อทดสอบ SOD ด้วย KCN ความเข้มข้นถึง 266 mM พบว่าแถบความว่องไวลดลงเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 17) ซึ่งแสดงว่า SOD จากใบยางที่แยกได้น่าจะเป็น MnSOD ซึ่ง สอดคล้องกับการพบ MnSOD ในใบยางพันธุ์ RRIM 600 (Miao and Gaynor, 1993) มีขนาดเล็กกว่าคือ 31,688 ดาลตัน

4.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ SOD จากใบยางพารา

4.6.1 ผลของไซยาไนด์ (CN^-)

ทั้ง NaCN และ KCN ยับยั้งความว่องไวของ SOD จากใบยางพาราได้คล้ายกันคือ ความว่องไวของ SOD ที่ลดลงจะแปรผันตามความเข้มข้นของ CN^- ที่เพิ่มขึ้น เช่น 4 mM ยับยั้งความว่องไวของ SOD จากใบยางพาราได้ครึ่งหนึ่ง (58%) (ตารางที่ 15) และที่ 14 mM พบว่ายับยั้งความว่องไวของ SOD จากใบยางพาราได้ถึง 95%

(ตารางที่ 16) ไซยาไนด์ยับยั้งการทำงานของ CuZnSOD โดย CN^- จับกับ Cofactor ของ CuZnSOD ทำให้ประจุบวกของ active site ลดลง ไปยับยั้งไม่ให้ O_2^- เข้าสู่ active site เนื่องจากต้องอาศัยแรงดึงจากประจุหรืออิเล็กตรอน (electrostatic channeling) ซึ่งเป็นแรงดึงดูดระหว่าง O_2^- และ active site ทำให้ SOD ไม่เร่งปฏิกิริยาดิสมิวเทชัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองในแมลงหวี่ โดย CN^- 1 และ 2 mM ยับยั้ง CuZnSOD ได้ 92 และ 100% ตามลำดับ (Lee *et al.*, 1981), CN^- 0.04, 0.1 และ 0.2 mM ยับยั้ง CuZnSOD ในแบคทีเรีย *Caulobacter crescentus* CB15 ได้ 50, 80 และ 89% ตามลำดับ (Steinman, 1982) และ CN^- 2 mM ยับยั้ง CuZnSOD ในใบสน Scot pine ได้ (Kapinska *et al.*, 2001) จะเห็นได้ว่า SOD จากใบยางพาราจะทนต่อ CN^- มากกว่า SOD จากสิ่งมีชีวิตอื่นเล็กน้อย เพราะ % การยับยั้งต่ำกว่า แต่ SOD ในบางสิ่งมีชีวิตทนต่อความเข้มข้นของ CN^- ได้สูงกว่า เช่น CN^- 5 mM ไม่ยับยั้ง MnSOD ในสาหร่ายแดง *Porphyridium cruentum* (Misra and Frodivich, 1977), CN^- 1 mM ไม่ยับยั้ง FeSOD ในบัว *Nuphar luteum* (Salin and Bridges, 1982) และ CN^- ตั้งแต่ 0.1-2.0 mM ไม่ยับยั้ง MnSOD ในใบถั่วลันเตา (Sevilla *et al.*, 1982) เป็นต้น จึงเป็นไปได้ว่า SOD ในใบยางพาราที่ไม่ถูกยับยั้งโดย CN^- อาจเป็น MnSOD ที่มีอยู่ในยางพารา หรืออาจจะกล่าวได้ว่าในใบยางพาราน่าจะมีทั้ง CuZnSOD และ MnSOD

เมื่อ SOD ทำปฏิกิริยากับ CN^- ความเข้มข้นสุดท้าย 266 mM ค้างคืนที่ $4^{\circ}C$ แล้วนำไปแยกโดย ND-PAGE และย้อมด้วย NBT พบว่า SOD มีความทนต่อ CN^- สูง แถบของ SOD ยังคงที่ แสดงว่าการจับของ SOD กับ CN^- น่าจะเป็นแบบย้อนกลับได้

4.6.2 ผลของ H_2O_2

H_2O_2 3 mM ยับยั้ง SOD จากใบยางได้ 16% (ตารางที่ 17) ซึ่ง H_2O_2 0.5 mM พบว่ายับยั้ง FeSOD จาก *Crithidia fasciculata, Leishmania tropica, Trypanosoma brucei* และ *T. cruzi* ได้ 87, 74, 86 และ 76% ตามลำดับ (Le Trant *et al.*, 1983) ในขณะที่ H_2O_2 2 mM ยับยั้ง FeSOD ในบัว *N. luteum* ได้ถึง 64% (Salin and Bridges, 1982)

H_2O_2 ยับยั้ง CuZnSOD (Baum and Scandalios, 1981; Ochoa *et al.*, 1995; Osatomi *et al.*, 2001) และ FeSOD (Kirby *et al.*, 1981; Barra *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1996) แต่ไม่ยับยั้ง MnSOD (Misra and Fridovich, 1977; Kono *et al.*, 1979; Baum and Scandalios, 1981; Sevilla *et al.*, 1982; Barnes *et al.*, 1996; Ozturk *et al.*, 1999; Carter *et al.*, 2000)

H_2O_2 ยับยั้งการทำงานของ CuZnSOD โดย Cu^{2+} ถูกรีดิวซ์เป็น Cu^{+} ทั้ง Cu^{+} และ H_2O_2 ทำให้เกิด 2-oxo-histidine และ Cu^{+} หลุดออก เอนไซม์จะสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ (Jewett *et al.*, 1999) และ H_2O_2 ลดความว่องไวของเอนไซม์โดย Fe^{2+} ซึ่งเคยจับกับ His75 เปลี่ยนไปจับกับ Val แทน (Halliwell and Gutteridge, 1989) จึงอาจกล่าวได้ว่า SOD ในใบยางพาราอาจเป็น CuZnSOD หรือ MnSOD ก็ได้

4.6.3 ผลของ SDS

SDS ความเข้มข้น 1 mM ยับยั้งความว่องไวของ SOD ได้ครึ่งหนึ่ง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS เป็น 2-3 mM พบว่า SDS ยับยั้งความว่องไวของ SOD ถึง 90% (ตารางที่ 18) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา SOD จากรา *Phanerochaete chrysosporium* (Ozturk *et al.*, 1999) และแบคทีเรีย *Cryptococcus neoformans* (Tesfa-Selase and Hay, 1995) ซึ่งพบว่า SDS ยับยั้งความว่องไวของ SOD ได้

sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็นสารแอนไอออนิกดีเทอร์เจนท์ (anionic detergent) ซึ่งทำลายพันธะนอนโควาเลนท์ทั้งหมด (Stryer, 1995) โดย SDS ไปจับกับโปรตีนส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ ยังผลทำให้โปรตีนคลายตัว (unfold) และสายโพลีเปปไทด์มีรูปร่างเป็นขดอิสระ (random coil) ทำให้มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป แสดงว่า SDS อาจไปจับกับบริเวณที่มีประจุบวกและบริเวณที่ไม่ละลายน้ำของ SOD นอกจากนี้ประจุลบ และสาย alkyl ของ SDS อาจทำให้ความคงตัวของ SOD ลดลงอีกด้วย (Raton, 1984)

4.6.4 ผลของ β-mercaptoethanol

β-mercaptoethanol ยับยั้งความว่องไวของ SOD จากใบยางพาราได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้น β-mercaptoethanol สูงขึ้น และที่ 5 mM ยับยั้ง SOD ได้ถึง

95% (ตารางที่ 19) β-mercaptoethanol รีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ ได้เป็น –SH group (Stryer, 1995) แสดงว่า พันธะไดซัลไฟด์ของ SOD ในใบยาง ทำให้มีรูปร่างเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาดิสมิวเทชัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Raton, 1984 แต่ SOD ในตับไก่ (Ozturk-Urek *et al.*, 2001) และ ในรา *P. chrysosporium* (Ozturk *et al.*, 1999) พบว่า β-mercaptoethanol 2 mM ไม่มีผลต่อความว่องไวของ SOD

4.6.5 ผลของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากตารางที่ 20 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น (0-25%) ความว่องไวของ SOD จะลดลง โดยที่ 25% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตยับยั้ง SOD ได้ถึง 74% อาจเป็นไปได้ว่า ในการเกิดปฏิกิริยาดิสมิวเทชันแรงดึงดูดระหว่างประจุและ divalent anion มีผลรบกวนการนำ O_2^- เข้าสู่ active site แต่ที่ 5% แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลตรงข้ามคือ ช่วยเพิ่มความว่องไวของ SOD 11% อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณไอออนเล็กน้อยช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาดิสมิวเทชันได้ดีขึ้น

4.7 pH ของบัฟเฟอร์ในการสกัด SOD

ในการสกัดใบยางด้วย Universal Buffer pH 2-12 เปรียบเทียบกับ 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 พบว่าความว่องไวของ SOD ต่อกรัมใบยางแทบไม่แตกต่างกัน(990-1,200 หน่วยต่อกรัม) ดังตารางที่ 21 แต่ปริมาณโปรตีนต่อกรัมใบยางจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น ค่าความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นเมื่อ pH ต่ำ ๆ ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของPalma *et al.*, 1997 ว่า pI ของ SOD ในพืชส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.2-4.9 เท่านั้น หาก SOD ตกตะกอนไปแล้วจึงไม่ควรมี SOD อยู่ในส่วนสารละลายที่สกัดได้ เมื่อสกัดใบยางด้วย Universal buffer ที่ pH 4-5 พบว่า มีปริมาณโปรตีนเพียง 0.042 มิลลิกรัม แต่ให้ค่าความว่องไวของ SOD สูงถึง 921-1,064 หน่วย แสดงว่า ค่าความว่องไว ที่ได้ไม่ใช่ SOD (เพราะว่า SOD จะตกตะกอน) แต่อาจเป็นสารโมเลกุลเล็ก ที่ละลายได้ในบัฟเฟอร์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองต้ม SOD (ตารางที่ 14)

การสกัดใบยางด้วย Universal buffer pH 7.5 กับ 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 พบว่า ใบยางที่สกัดด้วย 0.1 M. Tris-HCl ให้ค่าความว่องไวจำเพาะของ SOD สูงกว่า

Universal buffer แม้การสกัดด้วย Universal buffer ให้ค่าความว่องไวสูงกว่า 0.1 M. Tris-HCl (1,169 และ 885 หน่วย ตามลำดับ) แต่ปริมาณโปรตีนของใบยางที่สกัดด้วย Universal เป็นสองเท่าในใบยางที่สกัดด้วย 0.1 M. Tris-HCl (5.99 และ 2.7 มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ)

จากข้อมูลข้างต้นทำให้คิดว่าการหาความว่องไวของ SOD โดยวิธี NBT ที่ใช้ใน ข้อ 2.2.1 อาจเป็นเหตุให้ได้ค่าความว่องไวที่ไม่สะท้อนปริมาณของ SOD ในสารตัวอย่าง อาจเนื่องจากสารโมเลกุลเล็ก ทำให้ได้ค่าสูงเกินจริง จึงได้ทดลองหา SOD ด้วยวิธี cytochrome c เปรียบเทียบกับวิธี NBT (ตารางที่ 11,12) พบว่าค่าความว่องไวด้วยวิธี NBT ให้ค่าสูงกว่า cytochrome c ถึง 3.8, 3.6 เท่า ในส่วน S_1 และ S_4 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความว่องไวเมื่อผ่านคอลัมน์แล้วพบว่าวิธี cytochrome c ให้ค่าสูงกว่า NBT 2 และ 4.8 เท่าในคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-100 ตามลำดับ